

ЭКСПРЕССИЯ ПЕПТИДА M2e ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ H5N1 В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ РЯСКИ (*LEMNA MINOR* L.)

И. В. Тарасенко¹, Н. В. Гиляшова², А. П. Фирсов¹,
Т. Ю. Митюшкина¹, С. В. Долгов^{1,2}

¹Филиал Института Биоорганической химии РАН, Пушкино;

²Пушкинский государственный естественно-научный институт, Пушкино

starassenko@rambler.ru

Перспективным направлением развития современной биотехнологии является создание трансгенных растений, экспрессирующих различные целевые гены и использование растительных систем в качестве биофабрик по производству белков — «биофарминг». Растительные экспрессионные системы обладают значительным преимуществом перед биосистемами, основанными на использовании микробных и животных клеток поскольку позволяют во-первых синтезировать животные белки практически не изменяя их свойств, а во-вторых, существенно снизить стоимость конечного продукта. В последнее время рядом авторов Ряска малая (*Lemna minor*) рассматривается как перспективный объект для биофарминга, чему способствует такие особенности ряски как высокая скорость роста (время удвоения биомассы от 36 часов), преобладание вегетативного размножения и высокое содержание белка (до 45 % от массы).

Целью данного исследования было клонирование и анализ экспрессии в растениях ряски малой (*Lemna minor*) пептида M2e белка M2 вируса гриппа птиц A/chicken/Kurgan/5/2005(H5N1) для последующей разработки съедобной вакцины. Последовательность 5'-концевого фрагмента гена M2, включающего пептид M2e, была синтезирована методом лигирования синтетических олигонуклеотидов, с предварительной оптимизацией кодонного состава для экспрессии в ряске. Фрагмент был клонирован в растительном векторе pBI121 в трансляционном слиянии с N-концом в-глюкоронидазы под контролем 35S промотора вируса мозаики цветной капусты. Полученный вектор, pBIM130, был использован для агробактериальной трансформации растений ряски. Гистохимический и вестерн-блот анализы трансгенных растений показали стабильную экспрессию слитого гена M130-в-глюкоронидаза.

Следующим этапом работы стало клонирование гена M2e в трансляционном слиянии с геном стимулятора иммунного ответа (адьюванта).

Нами была выбрана последовательность субъединицы В рицина– лектина из клещевины (*Ricinus communis*), который применяется в качестве адъюванта при производстве «съедобных» вакцин растительной природы. На основе бинарного экспрессионного вектора pBI121 был клонирован ген M130 в трансляционном слиянии с 3'-концом гена субъединицы В рицина. Далее к слитому гену рицин В — M130 нами был добавлен сигнальный пептид PR1-белка табака, определяющий транспорт белков в апопласт. Также к 3'-концу гена M130 был добавлен фрагмент, кодирующий хитинсвязывающий домен из хитиназы А, что позволит использовать хитинсодержащие носители для оптимизации количества антигена в растительном экстракте. Плазмида, обозначенная как pBIspRM130, была использована для трансформации растений ряски. Было получено 23 линии трансгенных растений. Методом вестерн-блот анализа показан синтез целевого белка в пяти линиях.

EXPRESSION OF PEPTIDE M2e OF AVIAN INFLUENZA VIRUS H5N1 INTO TRANSGENIC PLANTS OF DUCKWEED (*LEMNA MINOR*)

I. V. Tarasenko¹, N. V. Gilyashova², A. P. Firsov¹,

T. Y. Mityushkina¹, S. V. Dolgov^{1,2}

¹ The Branch of Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushino; ² Pushino State Natural Scientific Institute, Pushino

Summary. N-terminal segment of M2 protein 30 amino acids in length, including peptide M2e was fused to the N- terminus of β -glucuronidase or C-terminus of ricin subunit B in the plant expression vector pBI121. The nucleotide sequence of the target fragment was synthesized by ligation of the synthetic oligonucleotides, its codon usage have been adapted previously for plant expression. As a result of peptide M2e of avian influenza virus H5N1 Curgan 2005 was successfully expressed in transgenic duckweed plants.